コシヒカリ LAMP 判別キット

" Koshihikari" LAMP Identification Kit

取扱説明書

version 2.0.0

製品コード

NE0121

コシヒカリ LAMP 判別キット
取扱説明書 version 2. 0. 0

【はじめにお読みください】

　このたびは、**コシヒカリ LAMP 判別キット**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いてコシヒカリの迅速判別を行うための試薬です。ヒト、動物への医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。

2. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】（2 ページ）に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6 ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。

3. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

4. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

5. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルおよび**陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

6. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照ください。
   株式会社ニッポンジーン； http://nippongene-analysis.com/

7. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

8. ＬＡＭＰ法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、ＬＡＭＰ法を用いたコメの品種判別用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

9. **コシヒカリ LAMP 判別キット**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。
   株式会社富士通システムズ・イースト
   e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）； http://genome.e-mp.jp/

目次

本キットに含まれているプライマーセット及びこのプライマーセットを用いた LAMP 法によるコシヒカリの判別技術は、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 岸根雅宏博士、奥西智哉博士によって開発されました。

1. キット説明

【コシヒカリ LAMP 判別キットの概要】

本キットは、LAMP法を利用して、コシヒカリとコシヒカリ以外の品種を 2 つの増幅検査によって検出し、精米及び炊飯米中のコメが、表示の通りコシヒカリであることを確認するためのキットです。

本キットでは、コシヒカリを除く生産上位品種が保有するいもち病真性抵抗性遺伝子 *Pii* と同一遺伝子と考えられている抵抗性遺伝子 *Pi5-1* の第一イントロンに相当する領域での増幅の有無にてコシヒカリを判別することができます。

本キットは、1 検体につき、コシヒカリ判別検査①及び②の 2 つの反応で結果を判定します。検体中にコシヒカリが存在する場合、本キットのコシヒカリ判別検査①で陽性と判定されます。一方で、検体中にコシヒカリ以外の品種が存在する場合は、コシヒカリ判別検査②で陽性と判定されます。最終的な判定は、コシヒカリ判別検査①及び②の結果を両方用いて行います。検体がコシヒカリのみで構成されている場合は、コシヒカリ判別検査①のみ陽性。コシヒカリに他品種が混入している場合は、コシヒカリ判別検査①及び②ともに陽性。コシヒカリ以外の品種のみで構成されている場合は、コシヒカリ判別検査②のみ陽性といった結果が得られます。

検査に必要な操作は、キットに添付されている**20×コメDNA抽出液①及び②**を用いて精米もしくは炊飯米から抽出したイネのゲノムDNAを検査混合液（**コシヒカリ判別検査液①もしくは②、酵素液、蛍光発色液**の混合液）に加えて63℃に40分間保温するのみであり、きわめて簡便です。結果の判定は、**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でコシヒカリ以外の品種が混入していないことを確認することが可能です。

重要

混入が判定可能な品種

ひとめぼれ、あきたこまち、ヒノヒカリ、ななつぼし、はえぬき、きらら397、まっしぐら、つがるロマン、こしいぶき、キヌヒカリ、あさひの夢、ほしのゆめ、ふさこがね、ハナエチゼン、夢つくし、ふさおとめ、あいちのかおり、ゆめぴりか、ふっくりんこ、おぼろづき、ゆめみづほ、夢しずく、てんたかく、彩のかがやき、さがびより、きぬむすめ、森のくまさん、まなむすめ、つや姫、なすひかり、にこまる、ゆきん子舞、イクヒカリ、あきまさり、ゴロピカリ

コシヒカリと同様の判定結果が得られる品種

めんこいな、ササニシキ、日本晴、アケボノ、ハツシモ、ミルキークイーン、チヨニシキ、秋の詩、ゆめひたち、朝日、いわてっこ、むつほまれ

＊上記は平成22年うるち米検査数量の96.7%を占める上位48品種です。

＊新潟県のコシヒカリについては、平成17年よりいもち病抵抗性遺伝子を導入したコシヒカリ新潟BLに切り替えられています。コシヒカリ新潟BLは、複数混植するマルチラインとして栽培されているため、新潟県産コシヒカリのバルク検査では、陽性・陰性の両方で陽性判定になることが予想されます。（BL2号、10号及び11号は、*Pii*を有している。）

【LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社

Eiken GENOME SITE； http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアルホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル； http://www.nippongenematerial.com/

2. キット内容

【キット内容と保存温度】
コシヒカリ LAMP 判別キット
48 テスト用（製品コード： NE0121）

試薬名 （チューブラベル）	頭部ラベル 色	内容量 48 テスト用	保存温度
取扱説明書	−	1 部	室温
検査用チューブ	−	100 本	室温
コシヒカリ判別検査液①	赤色	1,025 µl	−20°C（遮光）
コシヒカリ判別検査液②	緑色	1,025 µl	−20°C（遮光）
酵素液	黄色	100 µl	−20°C（遮光）
蛍光発色液	紫色	100 µl	−20°C（遮光）
陽性コントロール	灰色	125 µl	−20°C（遮光）
陰性コントロール（滅菌水）	白色	125 µl	−20°C（遮光）
ミネラルオイル	青色	1,000 µl × 2 本	−20°C（遮光）
20×コメ DNA 抽出液①	水色	25 ml × 2 本	−20°C（遮光）
コメ DNA 抽出液②	橙色	25 ml	−20°C（遮光）

取り扱い上の注意

◆ 本キットでは、48テスト分の検査溶液をまとめて作製することで、48 テスト分の検査反応を行うことが可能です。48 テスト分以下の検査反応を複数回に分けて行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。

◆ **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。

◆ **取扱説明書**および**検査用チューブ**以外の試薬は−20°Cで遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。

◆ 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20°Cで保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。

◆ **酵素液**を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。

◆ **陽性コントロール**は、コシヒカリ判別検査①及び②の鋳型DNAとして使用可能な配列を含むプラスミドDNA溶液です。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。

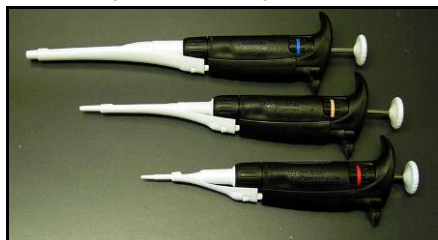
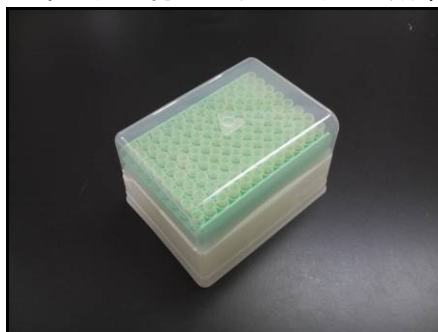
◆ 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

◆ **ミネラルオイル**に関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号）」に該当します。必ずMSDSを参照の上、使用してください。

◆ **20×コメ DNA 抽出液①に含まれる水酸化ナトリウム**に関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号）」に該当します。必ずMSDSを参照の上、使用してください。

3. 必要な器具、機器

【必ずご準備頂く器具、機器】

● マイクロピペット
（0.5−10 µl、10−100 µl、200−1,000 µl）

● フィルター付マイクロチップ（滅菌済）*

● マイクロチューブ
（1.5 ml あるいは 2.0 ml）

● 使い捨て手袋

● インキュベーター（恒温器）
ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー等、63°C、80°C それぞれの温度を保持する機器が必要です。

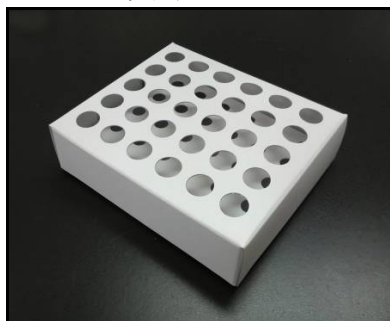
● 氷（クラッシュアイス）

● 遠沈管 （50 ml 容器）

● 滅菌水
20×コメ DNA 抽出液①の希釈用
DNA 原液の希釈用

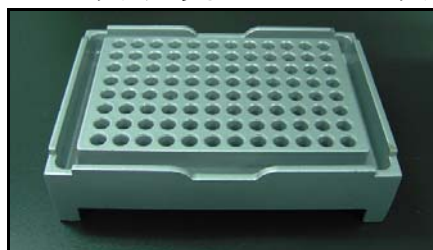
【その他の器具、機器】

　下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

● チューブラック*

● ボルテックスミキサー

● 簡易遠心機（1.5 ml チューブ用）

● 簡易遠心機（0.2 ml チューブ用）

● アルミラックあるいはプレートラック

● UV 照射装置
蛍光発色液による検出の際に使用します。240−260 nm あるいは 350−370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。

● 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

● フロートプレート*
ウォーターバスで保温する際に使用します。

　＊マイクロピペット、ピペットチップ、マイクロチューブなど、LAMP 法を用いた遺伝子検査を行うために必要な器具・消耗品類をまとめた**遺伝子ツールボックス**（製品コード： NE4111）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

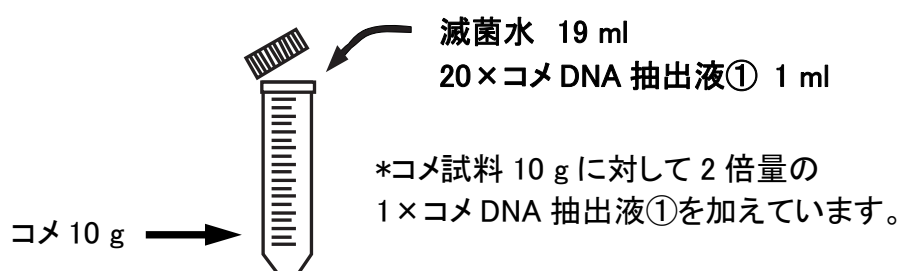
4. キット使用方法

【簡易プロトコル】

本キットの詳細な使用方法は 7 ページ以降を参照してください。

簡易プロトコル

1. 精米もしくは炊飯米に対して滅菌水と 20×コメ DNA 抽出液①を添加する。

精米もしくは炊飯米 10 g に対して、19 ml の滅菌水（別途ご用意ください）を加えた後、1 ml の 20×コメ DNA 抽出液①を添加して良く攪拌してください。

2. 30 秒間ボルテックスにて攪拌する。

炊飯米の場合：数回の転倒混和によって塊をばらした後にボルテックスにて攪拌して下さい。

3. 混合液 0.5 ml を新しいチューブへ回収し、0.5 ml（等量）のコメ DNA 抽出液②を添加する。

4. 10 秒間ボルテックスした後、卓上遠心機にて 1 分間遠心する。

炊飯米の場合は、卓上遠心機にて 3 分間遠心してください。

微量高速遠心機がある場合は、12,000 x g 以上にて 1 分間遠心してください。

5. 上清を新たなチューブへ回収し、DNA 原液とする。

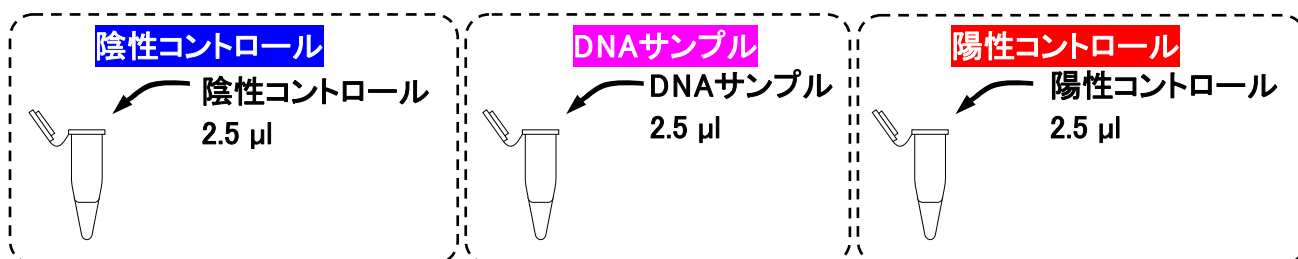
6. コシヒカリ判別検査混合液①及び②をそれぞれ必要量まとめて作製する。

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
コシヒカリ判別検査液① もしくは コシヒカリ判別検査液②	20.5 µl	184.5 µl	512.5 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
酵素液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
検査溶液合計	22.5 µl	202.5 µl	562.5 µl

＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

7.　コシヒカリ判別検査混合液①及び②を検査用チューブへそれぞれ 22.5 μl ずつ分注する。

8.　5 の工程で得られた DNA 原液を希釈した DNA サンプル 2.5 μl を添加する。

DNA 原液を希釈し、これを DNA サンプルとする。
DNA 原液を滅菌水で、精米は 10 倍、炊飯米は 2 倍に希釈する。

＊ コンタミネーション防止のため、陽性コントロールは必ず最後に添加する。

9.　ミネラルオイルを添加する。

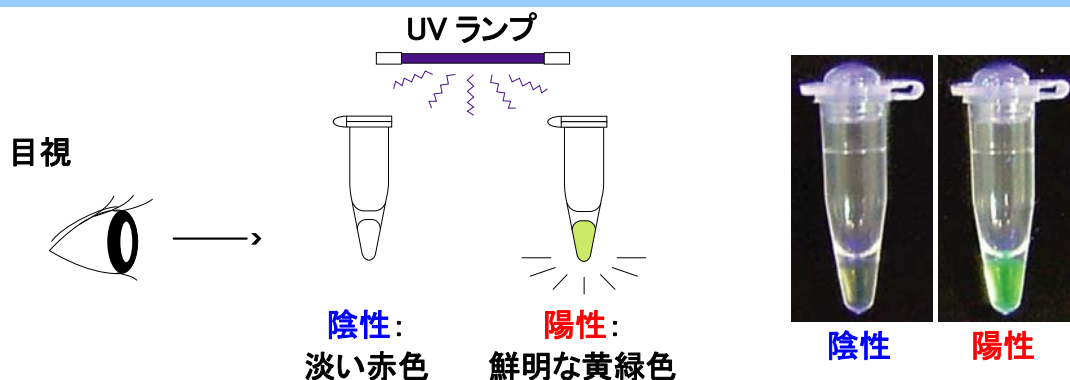
＊ 蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますので、必要な場合は本キットに添付のミネラルオイルを 20.0 μl 程度重層してください。

10.　63°C、40 分間（検査反応）。

＊ 検査反応は 40 分間以上行わないでください。

11.　80°C、2 分間（検査反応停止）。

＊ 検査反応終了後速やかに判定を行う場合、この操作を行う必要はありません。

12.　判定。

【検査を行う前の準備および注意事項】

サンプルの準備

■　**コントロール**

本キットには、検査の成否を確認するための**陽性コントロール**と**陰性コントロール**が添付されています。検査の成否を確認するには、**陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」および**陰性コントロール**を添加する「陰性コントロール検査溶液」の作製が重要です。

■　**コメ DNA の準備**

検査には精米もしくは炊飯米から抽出したDNAを使用します。本キットは、精米もしくは炊飯米からコメのゲノムDNAの簡易抽出を行うための試薬（2 種類） および簡易抽出プロトコルを備えていますので、検査を行う前にDNAを準備してください。

器具、機器の準備

■　**インキュベーター（恒温器）**

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、63℃と 80℃に温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■　**器具**

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

　LAMP法は高感度なDNA増幅技術であるため、検査環境に**陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプルおよび**陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■　作業区域

　核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では**陽性コントロール**およびLAMP法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないでください。

　検査溶液へのサンプルおよび**陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■　核酸除去操作

　器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよくすすぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

　高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

＜方法＞

i)　使い捨て手袋を装着します。
ii)　有効塩素濃度 10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii)　次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv)　非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よくすすいで乾燥します。
v)　作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

【詳細な使用方法】

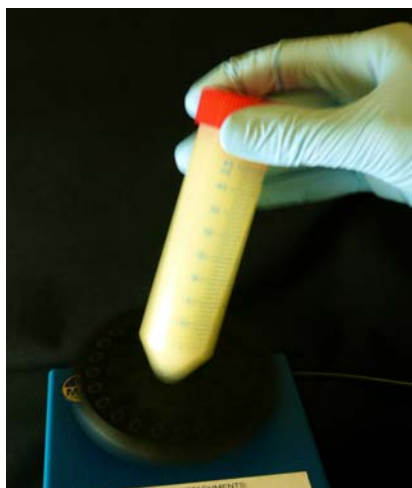
DNA の抽出

本キットは、精米及び炊飯米からゲノム DNA の簡易抽出を行うための **20×コメ DNA 抽出液①**、**コメ DNA 抽出液②**、および抽出プロトコルを備えています。

試料のサンプリング

検査対象の精米もしくは炊飯米 10 g を分取します。より正確な検査結果を得るために、試料をよく混ぜてからもちいるか、複数箇所から、試料を分取してください。

精米もしくは炊飯米は、50 ml 遠心管等の清潔な容器に分取してください。

ゲノム DNA の抽出

DNA 抽出液②を取り出し、室温で完全に融解し、容器のキャップを閉じた状態で容器を 10 回上下に反転させて転倒混合します。

精米もしくは炊飯米を分取した容器へ滅菌水を 19 ml 加えた後、混合して均一になった **20×コメ DNA 抽出液①**を 1 ml 加え、ボルテックスミキサーにて 30 秒間良く撹拌します。

（炊飯米の場合は、数回の転倒混和によって塊をばらした後にボルテックスにて撹拌してください。）

混合溶液の上澄み（水層） 0.5 ml を新しいマイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）へ回収し、**コメ DNA 抽出液②** 0.5 ml（回収した水層と等量）を添加します。ボルテックスミキサーにて 10 秒間攪拌した後、卓上遠心機にて 1 分間、炊飯米の場合は、3 分間遠心します。微量高速遠心機がある場合は、12,000 x g にて 1 分間遠心してください。

上清を新たなマイクロチューブ（1.5ml あるいは 2.0 ml）へ回収し、これを DNA 原液とします。

20×コメ DNA 抽出液①とコメ

重要

本検査に用いる試料（精米もしくは炊飯米）は、フードカッター等で破砕せずにゲノム DNA の抽出操作を行ってください。また、DNA 抽出後の遠沈管（50 ml容器）から水層を回収する際は、容器の蓋の裏に付着したコメ DNA 抽出液等に留意し、DNA による汚染に注意してください。

検査反応

試薬の融解

コシヒカリ判別検査液①、**コシヒカリ判別検査液②**、**陽性コントロール**、**陰性コントロール**及び、**ミネラルオイル**を取り出し、室温で完全に融解します。**酵素液**及び**蛍光発色液**は−20℃では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

混合とスピンダウン

チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて1秒間 x 3回の撹拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

検査混合液の作製

マイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。これを検査混合液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量＞

試薬	1テスト あたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
コシヒカリ判別検査液① もしくは コシヒカリ判別検査液②	20.5 µl	184.5 µl	512.5 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
酵素液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
検査混合液合計	22.5 µl	202.5 µl	562.5 µl

＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1テスト分多めに作製する。

重要

連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回ごとに使い捨てとして使用してください。

酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないよう、ご注意ください。また、使用前にスピンダウンを行ってください。

検査混合液①及び②の分注

核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査混合液①及び②をそれぞれ 22.5 µl ずつ分注します。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

DNAサンプルの添加

下記の通り希釈した DNA サンプルを 2.5 µl 検査混合液①及び②に添加後、蒸発による検査溶液の濃縮を防ぐため本キットに添付の**ミネラルオイル**を 20 µl 程度重層し、キャップを閉じます（蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますのでご注意ください)。なお、インキュベーター（恒温器）として、ホットボンネット機能を有するサーマルサイクラーを使用する場合には、ミネラルオイルの添加は不要です。

重要

DNA 原液を滅菌水で希釈し、これを DNA サンプルとします。精米の場合で 10 倍希釈(例：DNA 原液 10 µl＋滅菌水 90 µl)、炊飯米の場合で 2 倍希釈(例：DNA 原液 50 µl＋滅菌水 50 µl)を行って検査に用いてください。

陰性コントロールと陽性コントロールを作製してください。

この時の注意事項として、サンプルと**ミネラルオイル**の添加は必ず、①陰性コントロールサンプル、②DNA サンプル、③陽性コントロールサンプル、の順に行ってください。また、サンプル添加後は速やかにキャップを閉じてください。

なお、陰性コントロールサンプルには 2.5 µl の**陰性コントロール**（滅菌水）を添加し、陽性コントロールサンプルには 2.5 µl の**陽性コントロール**を使用してください。

検査反応

全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーターなどを用いて 63°C で 40 分間保温します。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、**検査用チューブ**が反応中に傾かないようにしてください。

判定

検査の成否の判定

40 分間保温した後、80°Cで 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240-260 nm あるいは 350-370 nm の波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は40分間が経過した時点の発色で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

DNA サンプルの判定

陽性及び陰性コントロール検査液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、DNA サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。

＜判定のポイント＞

明確な蛍光の発色が認められるサンプル

検査陽性と判定します。コシヒカリ品種の判別は、下図の発色パターンⅠ～Ⅲを参照してください。仮に蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査液と比較した際に差異が認められる場合には、検査対象の精米もしくは炊飯米から再度サンプルを採取して検査を行ってください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

検査陰性と判定します。下図の発色パターンⅠ、Ⅲ、Ⅳを参照してください。

＜発色パターンの例＞

発色パターン	I	II	III	IV
コシヒカリ判別検査①	陽性	陽性	陰性	陰性
コシヒカリ判別検査②	陰性	陽性	陽性	陰性
判定	コシヒカリ**	コシヒカリとコシヒカリ以外の品種が混在	コシヒカリ以外の品種**	再検査

** 本キットは、コシヒカリと明記されている精米や炊飯米の確認検査を目的として設計されています。判定可能品種は、7.の付録（p16）に詳細が記載されておりますので、これらを確認した後、判定を行ってください。

パターンⅣの場合

再度検査をやり直してください。再検査でも同様の結果が得られる場合は、検査不能と判定されます。原因として、検査対象が炊飯米である場合は、高圧で炊飯すること等によって、DNA が分解・除去されてしまっている可能性が考えられます。

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. 陽性コントロールの添加量が過剰である。** **陽性コントロール**の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。**陽性コントロール**の添加量は取扱説明書の指示に従ってください。 **B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 **C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240–260 nm あるいは 350–370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行ってください。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じてください。

6. 文献・資料

1. 岸根雅宏、奥西智哉 (2011) LAMP 法を利用したコシヒカリの高精度・迅速識別 日本食品化学工学会誌 Vol.58, No.12, 584-589

2. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **28** (12): e63

3. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc. 3 (5): 877

7. 付録

【品質管理】

キットに添付の**陽性コントロール** 2.5 μl を鋳型 DNA として 25 μl（1 テスト分）の容量でDNA増幅反応（コシヒカリ判別検査液①及び②を使用）を行い、63°C、40 分間でいずれの検査液も**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

【陽性コントロール】

陽性コントロールは、コシヒカリ判別検査①及び②の増幅配列を含む直鎖状のプラスミド DNA が 2.5 μl あたり、1 pg 添加されている溶液です。

【判定可能品種】

コシヒカリ判別検査①では、コシヒカリの有無を確認し、コシヒカリ判別検査②では、コシヒカリ以外の品種の混入を確認し、2つの検査結果から判定を行います。ただし、下記の通り、コシヒカリと同様の判定結果が得られる品種もございますので、判定の際には十分留意してください。

コシヒカリと判別可能な品種 （検査①：陰性、検査②：陽性）p.13 発色パターン例Ⅲ

2, ひとめぼれ; 3, あきたこまち; 4, ヒノヒカリ; 5,ななつぼし; 6,はえぬき; 7, きらら397; 8, まっしぐら; 9, つがるロマン; 10, こしいぶき; 11, キヌヒカリ; 12, あさひの夢; 13, ほしのゆめ; 14, ふさこがね; 15, ハナエチゼン; 16, 夢つくし; 17, ふさおとめ; 20, あいちのかおり; 21, ゆめぴりか; 22, ふっくりんこ; 25, おぼろづき; 26, ゆめみづほ; 27, 夢しずく; 28, てんたかく; 30, 彩のかがやき; 31, さがびより; 32, きぬむすめ; 35, 森のくまさん; 36, まなむすめ; 37, つや姫; 39, なすひかり; 40, にこまる; 41, ゆきん子舞; 42, イクヒカリ; 44, あきまさり; 46, ゴロピカリ

コシヒカリと同様の判別結果が得られる品種 （検査①：陽性、検査②：陰性）p.13 発色パターン例Ⅰ

18, めんこいな; 19, ササニシキ; 23, 日本晴; 24, アケボノ; 29, ハツシモ; 33, ミルキークイーン; 34, チヨニシキ; 38, 秋の詩; 43, ゆめひたち; 45, 朝日; 47, いわてっこ; 48, むつほまれ

＊ 新潟県のコシヒカリについては、平成17年よりいもち病抵抗性遺伝子を導入したコシヒカリ新潟BLに切り替えられています。コシヒカリ新潟BLは、複数混植するマルチラインとして栽培されているため、新潟県産コシヒカリのバルク検査では、検査①・検査②の両方で陽性判定になることが予想されます。（BL2号、10号及び11号は、*Pii*を有している。）

＊ 品種名の前に記載されている数字は、平成22年度うるち米検査数量の上位48品種の順位です。本キットでは、全体の96.7%の品種について判定結果を確認しています。

- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2015 年 5 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-6712-3885
FAX	03-6712-3886
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp